



PATENT
671302-2004

JSW

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant(s) : Tomoyuki SHIRAI et al
Filed : February 23, 2004
Serial No. : 10/784,633
For : RAT HIGHLY SENSITIVE TO CARCINOGEN
Art Unit : 1632
Examiner : To Be Assigned

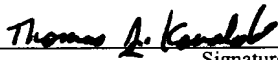
745 Fifth Avenue, New York, NY 10151

CERTIFICATE OF MAILING

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail in an envelope addressed to: **Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450, on July 22, 2004**

Thomas J. Kowalski, Reg. No. 32,147

(Name of Applicant, Assignee or Registered Representative)



Signature

August 19, 2004

Date of Signature

CLAIM OF PRIORITY

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450


Sir:

Enclosed are certified copies of the priority documents for the above named application. Applicants hereby claim priority under 35 U.S.C. §§119 and 120 from International Patent Application No. PCT/JP02/8373 and Japanese Application No. JP 2001-253241.

Acknowledgment of the claim of priority and of the receipt of said certified copies is requested.

Respectfully submitted,
FROMMER LAWRENCE & HAUG LLP

By:



Thomas J. Kowalski, Esq.
Reg. No. 32,147
T: (212) 588-0800

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 1 年 8 月 2 3 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 1 - 2 5 3 2 4 1
Application Number:

[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 1 - 2 5 3 2 4 1]

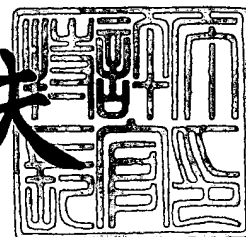
出 願 人 独 立 行 政 法 人 科 学 技 術 振 興 機 構
Applicant(s):

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

2 0 0 4 年 4 月 1 3 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫





【書類名】 特許願

【整理番号】 A031P81

【提出日】 平成13年 8月23日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A01K 67/027

【発明者】

 【住所又は居所】 愛知県名古屋市緑区黒沢台 2 - 1 2 1 0

 【氏名】 白井 智之

【発明者】

 【住所又は居所】 愛知県名古屋市瑞穂区松月町 3 - 1 4 - 3

 【氏名】 朝元 誠人

【発明者】

 【住所又は居所】 愛知県名古屋市昭和区丸屋町 6 - 7 9 パークハイツ桜
 山 3 0 6 号

 【氏名】 外岩戸 尚美

【特許出願人】

 【識別番号】 396020800

 【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

 【代表者】 沖村 憲樹

【代理人】

 【識別番号】 100107984

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 廣田 雅紀

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 044347

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0013099

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 発がん物質高感受性ラット

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ギャップジャンクションにおける正常機能が、阻害されていることを特徴とする発がん物質高感受性ラット。

【請求項 2】 ギャップジャンクションにおける正常機能の阻害が、コネクソンのチャンネル機能の阻害であることを特徴とする請求項 1 記載の発がん物質高感受性ラット。

【請求項 3】 コネクソンのチャンネル機能の阻害が、コネクシン機能の欠失に基づくものであることを特徴とする請求項 2 記載の発がん物質高感受性ラット。

【請求項 4】 コネクシン機能の欠失が、コネクシン 3 2 の変異に基づくものであることを特徴とする請求項 3 記載の発がん物質高感受性ラット。

【請求項 5】 プロモーターの下流に、変異させたラットコネクシン c D N A を組み込んだプラスミドベクターを構築し、該プラスミドベクターを受精卵にマイクロインジェクションした後、卵管に移植することを特徴とする発がん物質高感受性ラットの作製方法。

【請求項 6】 プロモーターがアルブミンプロモーターであり、変異させたラットコネクシン c D N A が、アミノ酸の一部を欠失させたラットコネクシン 3 2 のアミノ酸配列をコードする c D N A であることを特徴とする請求項 5 記載の発がん物質高感受性ラットの作製方法。

【請求項 7】 請求項 1 ～ 4 のいずれか記載の発がん物質高感受性ラットに、被検物質を投与することを特徴とする発がん性物質の検出方法。

【請求項 8】 請求項 1 ～ 4 のいずれか記載の発がん物質高感受性ラットを用いて発がんさせたラットに、被検物質を投与することを特徴とする抗がん物質のスクリーニング方法。

【請求項 9】 発がん物質高感受性ラットの発がんが、発がん性物質の投与によるものであることを特徴とする請求項 8 記載の抗がん物質のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】**【0 0 0 1】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、発がん物質に高感受性を有するラット、特に、ギャップジャンクションにおける正常機能が阻害され、発がん物質に対して高感受性を有するラット、及びその作製方法、用途に関する。

【0 0 0 2】**【従来の技術】**

ギャップジャンクション（ギャップ結合）は、細胞の間隙接合部が、隣接する細胞の形質膜の続きである境界膜（intercalated disk）が近接し、見かけ上密着した構造をとったもので、多くの細胞・組織に分布している。ギャップジャンクションは、細胞内シグナル伝達物質を隣接する細胞に伝達する細胞間コミュニケーションの役割を担い、多細胞生物体の細胞増殖のホメオスターシス（恒常性）維持に役立っていると考えられている。細胞のがん化とは、正常細胞のホメオスターシスから逸脱した細胞増殖として捉えることが出来、ギャップジャンクションの機能の阻害が細胞のがん化に重要な役割を果たしていると考えられている（「実験医学」Vol. 11、No. 16、28-33、1993、Histol. Histopathol. 12、761-768、1997）。

【0 0 0 3】

例えば、ある細胞の遺伝子に変異が起き、がん化の初期段階にある細胞（イニシエーション細胞）が存在していたとしても、周囲の正常細胞との細胞間連絡能が保たれていれば、イニシエーション細胞のがん細胞としての形質発現が抑制され、結果として発がん過程の進行が抑制されることが考えられる。実際、約 3 0 0 種類の発がん物質及び発がん促進物質の約 6 0 % のものが、細胞を用いたインビトロ（in vitro）の系で、細胞間連絡能を阻害することが知られている。また、ヒト及びラット、マウスの各種臓器の発がん過程においてコネクシンタンパク質の発現低下が認められており、ギャップジャンクションの異常は発がんに大きく関わっていることが推測される。

【0 0 0 4】

ギャップジャンクションは、隣り合った細胞の 1 つずつが形成する半チャネル (hemichannel)、すなわちコネクソン (connexon) が対になってできる細胞間チャネルである。コネクソンは、隣接する細胞の形質膜の続きである境界膜を貫通する円筒状のタンパク質が架橋を形成した構造を有している。このチャネルは、分子量約 1 k D までの物質が、細胞内から隣りの細胞内へ移行する機能をもつ。コネクソンは、コネクシン (connexin) と呼ばれるタンパク質が 6 つ集まってできている。コネクシンの種類は多数あり、現在までに 1 2 の異なったコネクシン c D N A がクローニングされている。コネクシンは、コードしているタンパク質の大きさをもとにして命名されており、それぞれコネクシン 2 6、コネクシン 3 2 (配列番号 2)、コネクシン 4 3 (c x 2 6、c x 3 2、c x 4 3) のように呼ばれている (「実験医学」Vol. 11, No. 16, 28-33, 1993)。

【 0 0 0 5 】

既に、肝臓で主に発現しているコネクシン 3 2 遺伝子欠失マウスがドイツのグループにより作製され、報告されている (CANCER RESEARCH, 60, 5087-5091, 2000、Carcinogenesis vol. 20, no. 7, 1379-1382, 1999、Current Biology, 7, 713-716, 1997)。しかしながら、マウスは元来ラットに比較して、肝発がん物質及び肝発がん修飾物質に対しての反応性が弱い。

一方、ラットにおいては肝前がん病変マーカーとしてのグルタチオン S-トランスフェラーゼ胎盤型 (G S P-T) が存在し、前がん病変を解析対象として短期間で効率良く計測できる。また、マウスではラットでの G S T-P のような前がん病変マーカーは存在しない。現在のところ、ラットの E S 細胞は確立されておらず、遺伝子欠失ラット作製は不可能である。

【 0 0 0 6 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、短期間に、高感度でより簡便に発がん物質の検出を可能とするために、発がん物質に高感受性を有するラットを提供すること、及び該ラットを用いて、発がん物質を検出する方法、更には、がんを発症させた該ラットを用いて抗がん物質のスクリーニングを行う方法を提供することからなる。

【 0 0 0 7 】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究の結果、ギャップジャンクションにおける正常機能が阻害された、特にコネクソンのチャンネル機能の阻害されたラットが、発がん物質に高感受性を持つことを見出し本発明をなした。コネクソンのチャンネル機能の阻害には、コネクシンの遺伝子の一部を欠損させ、コネクシン機能の欠失した遺伝子を組み込んだプラスミドベクターをラットに導入してトランスジェニックラットを作製する。本発明のラットを用いることにより、短期間に、高感度でより簡便に発がん物質の検出を行うことが可能となり、また、がんを発症させた本発明のラットは、抗がん物質のスクリーニングに有効に利用することができる。

【0 0 0 8】

すなわち本発明は、ギャップジャンクションにおける正常機能が、阻害されていることを特徴とする発がん物質高感受性ラット（請求項 1）や、ギャップジャンクションにおける正常機能の阻害が、コネクソンのチャンネル機能の阻害であることを特徴とする請求項 1 記載の発がん物質高感受性ラット（請求項 2）や、コネクソンのチャンネル機能の阻害が、コネクシン機能の欠失に基づくものであることを特徴とする請求項 2 記載の発がん物質高感受性ラット（請求項 3）や、コネクシン機能の欠失が、コネクシン 3 2 の変異に基づくものであることを特徴とする請求項 3 記載の発がん物質高感受性ラット（請求項 4）からなる。

【0 0 0 9】

また本発明は、プロモーターの下流に、変異させたラットコネクシン cDNA を組み込んだプラスミドベクターを構築し、該プラスミドベクターを受精卵にマイクロインジェクションした後、卵管に移植することを特徴とする発がん物質高感受性ラットの作製方法（請求項 5）や、プロモーターがアルブミンプロモーターであり、変異させたラットコネクシン cDNA が、アミノ酸の一部を欠失させたラットコネクシン 3 2 のアミノ酸配列をコードする cDNA であることを特徴とする請求項 5 記載の 発がん物質高感受性ラットの作製方法（請求項 6）や、請求項 1 ～ 4 のいずれか記載の発がん物質高感受性ラットに、被検物質を投与することを特徴とする発がん性物質の検出方法（請求項 7）や、請求項 1 ～ 4 のい

ずれか記載の発がん物質高感受性ラットを用いて発がんさせたラットに、被検物質を投与することを特徴とする抗がん物質のスクリーニング方法（請求項 8）や、発がん物質高感受性ラットの発がんが、発がん性物質の投与によるものであることを特徴とする請求項 8 記載の抗がん物質のスクリーニング方法（請求項 9）からなる。

【0 0 1 0】

【発明の実施の形態】

本発明は、ギャップジャンクションにおける正常機能が阻害されているラットを作製すること、特にギャップジャンクションにおけるコネクソンのチャンネル機能が阻害されているラットを作製することよりなる。現在のところ、ラットについては、ES 細胞が確立されておらず、遺伝子欠失ラットの作製は不可能であるが、コネクシン分子 6 量体よりチャンネルが形成されるコネクソンは、その 6 量体のうち 1 つでも変異コネクシンが存在すると、チャンネルの機能が阻害されるため、正常コネクシンの機能の発現を欠く。したがって、変異コネクシン遺伝子を持つ、トランスジェニックラットを作製することにより、ギャップジャンクションにおける正常機能が阻害されているラットを作製することができる。

【0 0 1 1】

変異するコネクシン遺伝子は特に限定されないが、正常コネクシンの機能の発現を欠く変異コネクシン 3 2 遺伝子が有利に用いることが出来る。正常コネクシンの機能の発現を欠く変異コネクシンを作製するためには、種々の変異方法を利用することができるが、コネクシンをコードする遺伝子の一部を欠失させた cDNA を使用する方法が有利に利用出来る。正常コネクシンの機能の発現を欠く変異コネクシン 3 2 遺伝子で変異したトランスジェニックラットは、変異コネクシン 3 2 が存在するため、肝細胞には正常機能を有するギャップジャンクションが形成されず、イニシエートされた細胞は、周囲の正常細胞によるギャップジャンクションを通しての変異形質発現の制御が十分に行われなない。したがって、前がん病巣はより有利な増殖環境にあることになり、発がん物質に対して高感受性形質を発現することになる。

【0 0 1 2】

本発明において、変異させたラットコネクシン遺伝子をラットに導入するには、この分野で用いられる適宜な方法を用いることができるが、プロモーターの下流に、変異させたラットコネクシン cDNA を組み込んだプラスミドベクターを構築し、該プラスミドベクターを受精卵にインジェクションした後、卵管に移植する方法が、有利に利用される。プロモーターとしては、特に限定はされないが、アルブミンプロモーターが特に好ましく、このプロモーターの下流に、例えば、アミノ酸の一部を欠失させる等して変異させたラットコネクシン cDNA を組み込んだプラスミドベクターを構築し、このプラスミドベクターをラットの受精卵雄性前核にインジェクションして、これを偽妊娠状態の雌卵管に移植することにより、トランスジェニックラットを得ることができる。

【0013】

本発明のラットは、発がん性物質の検出に利用される。すなわち、本発明の発がん物質高感受性ラットに、被検物質を投与し、発がん性物質の検出を行う。被検物質の投与方法、及び発がん性物質の検出方法は、通常この分野で用いられる方法が使用され、特に限定はされない。また、本発明においては、本発明の発がん物質高感受性ラットを用いて発がんさせた個体に、被検物質を投与することにより抗がん物質のスクリーニングを行うことができる。ラットの発がんには、発がん物質を用いることができる。被検物質の投与方法、及び抗がん物質の検知方法は、通常この分野で用いられる方法が使用され、特に限定されない。

【0014】

【実施例】

以下に、実施例をあげてこの発明を更に具体的に説明するが、この発明の範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

実施例 1（導入遺伝子の構築）

アルブミンプロモーター下にラットコネクシン 32 cDNA（GeneBank, NM017251：配列番号 1）を連結した遺伝子を組み込んだプラスミドベクター Cx32/pGEM-Alb を山崎洋博士（IARC, Lyon、関西学院大学理学部）より供与を受けた。このコネクシン 32 cDNA の 113～124 番目のアミノ酸を欠失させ、さらにこの遺伝子の導入後のマーカーとするために、終止コドンの直前に 6 個のヒスチジ

ンを挿入したもの（配列番号3）をExSite-PCR-Based Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を用いて作製した（図1）。このコンストラクトをApa I とMlu Iでプラスミド部分から切り出し、導入遺伝子とした。

【0015】

実施例2（トランスジェニックラットの作製）

上記の導入遺伝子をSDラットの受精卵雄性前核にマイクロインジェクションし、得られた卵細胞を培養した後、偽妊娠状態の雌卵管に移植することにより、仔ラットを得た。得られた産仔の尾部よりDNAを抽出し、導入遺伝子に対してはプライマー1（5'-AACGTGGCGCAGGTGGTGTA-3'；配列番号4：P1）とプライマー2（5'-ATGGTGATGGTGATGATGGC-3'；配列番号5：P2）を、内因性コネクシン32（Cx32）に対してはプライマー3（5'-GGGAAGGTTTGATGGAGTAAT-3'；配列番号6：P3）を用い、PCR法にて導入遺伝子の確認を行った。プライマー2は導入したヒスチジンに対応するもので、プライマー1とともに導入遺伝子が存在するときのみPCR産物が得られる。また、導入遺伝子の肝臓での発現を検索するために、肝臓より全RNAを抽出し、RT-PCR法を行った（図2）。図2中のTg-Hはトランスジェニックラットの導入遺伝子発現が高い系統、Tg-Gはトランスジェニックラットの導入遺伝子発現が低い系統、Wildは野生型ラット（SDラット）をそれぞれ意味する。その結果、合計5匹のラットに導入遺伝子の存在を確認したが、そのうち4匹が次世代に導入遺伝子を伝え、さらにそれらの系統の内2系統において肝臓にかかる導入遺伝子のmRNAが発現していることを確認した。これら2系統のうち発現が高い系統を以下の実施例に用いた。なお、以下の実施例に用いたトランスジェニックラットは雄のトランスジェニックラットと野生型雌SDラットを掛け合わせることで得られたものである。

【0016】

実施例3（コネクシン32の蛍光免疫染色）

実施例3により得られたトランスジェニックラット及び野生型ラットの肝臓の凍結切片を-20℃で5分間アセトンにて固定した後風乾し、メタノール/H₂O₂で処理することによりブロックした。かかる凍結切片を抗コネクシン32ウ

サギポリクローナル抗体 (Z y m e d 社製) 共存下でインキュベーションし、続いてビオチン化抗ウサギ I g G 抗体 (V e c t o r 社製) 及び F I T C 標識ストレプトアビジン (V e c t o r 社製) を用いて蛍光免疫染色し、その局在を蛍光顕微鏡 (A X 7 C ; オリンパス社製) で観察した。その結果、野生型ラットの肝臓のコネクシン32の局在は隣り合う肝細胞の膜上にスポット状に多数認められた。一方、トランスジェニックラットの肝臓にはコネクシン32の明らかな局在は全く認められなかった。従って、導入したコネクシン32の発現によって、正常の内在性コネクシン32の膜へのスポット状の局在が阻害されていることが確認された (図3：参考写真1)。

【0017】

実施例4 (肝細胞間連絡能の測定)

ラットから肝臓を摘出後、約5mmの厚さに切り出し、その断面に垂直に約1mmの深さで切り込みをナイフで入れ、そこに0.05% l u c i f e r y e l l o w を充分量滴下し3分間静置後P B S で3回洗浄し、O T C コンパウンド (TissuTek, Miles社製) に包埋して凍結し、6 μ m の厚さの凍結切片をクリオスタットで作製し、蛍光顕微鏡下で蛍光色素の広がりを観察した。このことから、野生型ラットの肝臓ではナイフで傷付けられた細胞から取り込まれた蛍光色素が、ギャップジャンクションによる細胞間連絡により周囲の肝細胞に広く拡散していることが明らかとなった。一方、トランスジェニックラットの肝臓では、その蛍光色素の広がりが明らかに少なく、細胞間連絡能が阻害されていることが明らかとなった。

【0018】

実施例5 (ジエチルニトロサミンによる肝発がん感受性の検索)

8週齢の雄のトランスジェニックラット又は野生型ラットに200mg/kgのジエチルニトロサミンを腹腔内投与し、投与後20週間観察して屠殺剖検した。上記各ラットから取り出した肝臓をアセトンにて固定し、パラフィン包埋、薄切し、肝前がん病変マーカーであるG S T - P を免疫染色して視覚化した (図4左：参考写真2)。また、G S T - P 陽性細胞巢の単位面積あたりの陽性細胞巢数と面積を画像解析装置 (I P A P、オリンパス社製) にて計測した (図4右)

。これらの結果、前癌病変巣であるGST-P陽性細胞巣の単位面積（ 1 cm^2 ）あたりの数は野生型ラットでは11、1個に対してトランスジェニックラットでは79.8個と激増しており、面積では、野生型ラット 0.2 mm^2 、トランスジェニックラット 3.32 mm^2 と著増していた。従って、このトランスジェニックラットは肝発がん物質であるジエチルニトロサミンに非常に高感受性であることが明らかとなった。

【0019】

実施例6（cDNAアレイ及びRT-PCRによるトランスジェニックラットの肝特異的遺伝子発現）

雄トランスジェニックラット及び野生型ラットの肝から全RNAをISOGEN（日本ジーン）により抽出し、Atlas rat toxicology array（Clontech社製）を用いて各遺伝子発現の変化を検索した。

この結果から、cDNAアレイによる検索によって、トランスジェニックラットが野生型ラットに比較して発現が変化している遺伝子としてチトクロームp450（CYP）及びグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）の種々の分子種などの薬物代謝酵素の遺伝子が固定された。そこで、定量的RT-PCRによってCYP及びGSTの種々の分子種の発現変化をLightCycler（Roche社製）を用いた定量的RT-PCR法で検討した。このことから、最も明らかな変化はトランスジェニックラットの肝臓ではCYP1A1、CYP1A2の発現が高いことであった（図5）。これらの酵素はジエチルニトロサミンをはじめ多くの発がん物質の代謝活性化を行うものであり、このトランスジェニックラットの肝発がん感受性亢進の一つの機序と考えられる。従来より、細胞間連絡能の阻害は発がんのプロモーション作用に深く関与していると考えられてきたが、この実験結果は、さらに、細胞間連絡能の阻害が薬物代謝酵素の発現に影響を及ぼし、発がん物質が代謝活性化されやすい状態になることを明らかにした。

【0020】

【発明の効果】

本発明の、ギャップジャンクションにおける正常機能が阻害されたラットは、発がん物質に高い感受性を持ち、短期間に、高感度でより簡便に発がん物質の検

出を行うことが可能となる。また、がんを発症させた本発明のトランスジェニックラットは、抗がん物質のスクリーニングに有効に利用することができる等極めて高い利用性を有する。

【 0 0 2 1 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION

<120> Carcinogen-hypersensitive rat

<130> A031P81

<140>

<141>

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1485

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (32)..(883)

<400> 1

cgcagtgcca gggaggtgtg aatgaggcag g atg aac tgg aca ggt cta tac 52

Met Asn Trp Thr Gly Leu Tyr

1 5

acc ttg ctc agt ggc gtg aat cgg cat tct aca gcc att ggc cga gta 100

Thr Leu Leu Ser Gly Val Asn Arg His Ser Thr Ala Ile Gly Arg Val

10 15 20

tgg ctg tcc gtc atc ttt atc ttc aga atc atg gtg ctg gtg gtg gct 148

Trp Leu Ser Val Ile Phe Ile Phe Arg Ile Met Val Leu Val Val Ala

25 30 35

gca gag agc gtg tgg ggt gat gag aag tct tct ttc atc tgt aac acc 196

Ala Glu Ser Val Trp Gly Asp Glu Lys Ser Ser Phe Ile Cys Asn Thr

40 45 50 55

ctc cag ccg ggc tgt aac agc gtc tgc tat gac cat ttt ttc ccc atc 244

Leu Gln Pro Gly Cys Asn Ser Val Cys Tyr Asp His Phe Phe Pro Ile

60 65 70

tcc cat gtg cgc ctg tgg tcc ctg caa ctc atc ttg gtt tcc acc cca 292

Ser His Val Arg Leu Trp Ser Leu Gln Leu Ile Leu Val Ser Thr Pro

75 80 85

gct ctc ctc gtg gca atg cac gtg gct cac caa caa cac ata gaa aag 340

Ala Leu Leu Val Ala Met His Val Ala His Gln Gln His Ile Glu Lys

90 95 100

aaa atg cta cgg ctt gag ggg cac ggg gac ccc ctt cac ctg gaa gag 388
Lys Met Leu Arg Leu Glu Gly His Gly Asp Pro Leu His Leu Glu Glu
105 110 115

gta aag agg cac aag gtg cac atc tca ggg aca ctg tgg tgg acc tat 436
Val Lys Arg His Lys Val His Ile Ser Gly Thr Leu Trp Trp Thr Tyr
120 125 130 135

gtc atc agt gtg gtg ttc cgg ctg ctg ttt gag gct gtc ttc atg tat 484
Val Ile Ser Val Val Phe Arg Leu Leu Phe Glu Ala Val Phe Met Tyr
140 145 150

gtc ttc tat ctg ctc tac ccg ggc tat gcc atg gtg cgg ctg gtc aag 532
Val Phe Tyr Leu Leu Tyr Pro Gly Tyr Ala Met Val Arg Leu Val Lys
155 160 165

tgt gag gcc ttc ccc tgc ccc aac acg gtg gac tgc ttc gtg tcc cgc 580
Cys Glu Ala Phe Pro Cys Pro Asn Thr Val Asp Cys Phe Val Ser Arg
170 175 180

ccc act gag aaa acc gtc ttc act gtc ttt atg ctc gcc gcc tcc ggc 628
Pro Thr Glu Lys Thr Val Phe Thr Val Phe Met Leu Ala Ala Ser Gly
185 190 195

atc tgc att atc ctc aac gtg gcg gag gtg gtg tac ctc atc atc cgg 676
Ile Cys Ile Ile Leu Asn Val Ala Glu Val Val Tyr Leu Ile Ile Arg
200 205 210 215

gcc tgt gcc cgc cgt gct cag cgc cgc tcc aat ccg ccc tcc cgc aag 724

Ala Cys Ala Arg Arg Ala Gln Arg Arg Ser Asn Pro Pro Ser Arg Lys

220

225

230

ggc tcg ggc ttc ggc cac cgc ctc tca cct gaa tac aag cag aat gag 772

Gly Ser Gly Phe Gly His Arg Leu Ser Pro Glu Tyr Lys Gln Asn Glu

235

240

245

atc aac aag ctg ctg agc gag cag gat ggc tct ctg aaa gac ata ctg 820

Ile Asn Lys Leu Leu Ser Glu Gln Asp Gly Ser Leu Lys Asp Ile Leu

250

255

260

cgc cgc agt cct ggc act ggg gcc ggg ctg gct gag aag agc gac cga 868

Arg Arg Ser Pro Gly Thr Gly Ala Gly Leu Ala Glu Lys Ser Asp Arg

265

270

275

tgc tca gcc tgc tga tgccgagtac caggcaacct cccatccaac ccctccctca 923

Cys Ser Ala Cys

280

ccccacccag gcctgccct ctttctccta tgctggtgag caggcctctg cctcctaggg 983

attactccat caaaccttcc ctccctccct actccccttc ctcagagagt cttctgtcaa 1043

agacctggcc ggcttgggag tggggagcca cttctgcacc agggctcaag gttattgagg 1103

gtgtgggcaa ttctttctgc ctataccctt tctcttcccc tctccctgag atgagggatg 1163

agatgttctg aaggtgtttc caattaggaa acgtaatctt aacccccatg ctgtcaggta 1223

ccccactttg ggagtcattg cagtggggag ggctgtgagc aagcagagtg gaggaggggc 1283

tctgcactgt ggatggagaa gggaggggag cttgccttgc tgcctgctac aaggaaaagg 1343

aggacacatc tagggtgggg gagttctgga gggagaagca ggcagataaa tcagagtggg 1403

ggttggtcag ggctgcccc agtccccagt tcccaaggcc tctctctctg aaaatgttac 1463

acattaaaca ggattttaca gt 1485

<210> 2

<211> 283

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 2

Met Asn Trp Thr Gly Leu Tyr Thr Leu Leu Ser Gly Val Asn Arg His

1 5 10 15

Ser Thr Ala Ile Gly Arg Val Trp Leu Ser Val Ile Phe Ile Phe Arg

20 25 30

Ile Met Val Leu Val Val Ala Ala Glu Ser Val Trp Gly Asp Glu Lys

35 40 45

Ser Ser Phe Ile Cys Asn Thr Leu Gln Pro Gly Cys Asn Ser Val Cys

50 55 60

Tyr Asp His Phe Phe Pro Ile Ser His Val Arg Leu Trp Ser Leu Gln

65 70 75 80

Leu Ile Leu Val Ser Thr Pro Ala Leu Leu Val Ala Met His Val Ala

85 90 95

His Gln Gln His Ile Glu Lys Lys Met Leu Arg Leu Glu Gly His Gly
 100 105 110
 Asp Pro Leu His Leu Glu Glu Val Lys Arg His Lys Val His Ile Ser
 115 120 125
 Gly Thr Leu Trp Trp Thr Tyr Val Ile Ser Val Val Phe Arg Leu Leu
 130 135 140
 Phe Glu Ala Val Phe Met Tyr Val Phe Tyr Leu Leu Tyr Pro Gly Tyr
 145 150 155 160
 Ala Met Val Arg Leu Val Lys Cys Glu Ala Phe Pro Cys Pro Asn Thr
 165 170 175
 Val Asp Cys Phe Val Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr Val Phe Thr Val
 180 185 190
 Phe Met Leu Ala Ala Ser Gly Ile Cys Ile Ile Leu Asn Val Ala Glu
 195 200 205
 Val Val Tyr Leu Ile Ile Arg Ala Cys Ala Arg Arg Ala Gln Arg Arg
 210 215 220
 Ser Asn Pro Pro Ser Arg Lys Gly Ser Gly Phe Gly His Arg Leu Ser
 225 230 235 240
 Pro Glu Tyr Lys Gln Asn Glu Ile Asn Lys Leu Leu Ser Glu Gln Asp
 245 250 255
 Gly Ser Leu Lys Asp Ile Leu Arg Arg Ser Pro Gly Thr Gly Ala Gly
 260 265 270
 Leu Ala Glu Lys Ser Asp Arg Cys Ser Ala Cys
 275 280

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Insertion
Sequence

<400> 3

catcatcacc atcaccattg a

21

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:P1

<400> 4

aacgtggcgc aggtggtgta

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:P2

<400> 5

atggtgatgg tgatgatggc

20

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:P3

<400> 6

gggaaggttt gatggagtaa t

21

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明において用いられる、アルブミンプロモーターの下流にラットコネクション 3 2 c D N A (GeneBank, NM017251) を連結した遺伝子を組み込んだプラスミドベクター Cx32/pGEM-Alb を示す図である。

【図 2】

本発明の方法により作製されたトランスジェニックラット（仔ラット）から全 R N A を抽出し、R T - P C R 法にて導入遺伝子の発現確認を行った結果を示す図である。

【図 3】

本発明のトランスジェニックラット及び野生型ラットの肝臓におけるコネクシ

ン 32 の局在を、蛍光免疫染色を用いて蛍光顕微鏡下で観察した結果を示す図である。

【図 4】

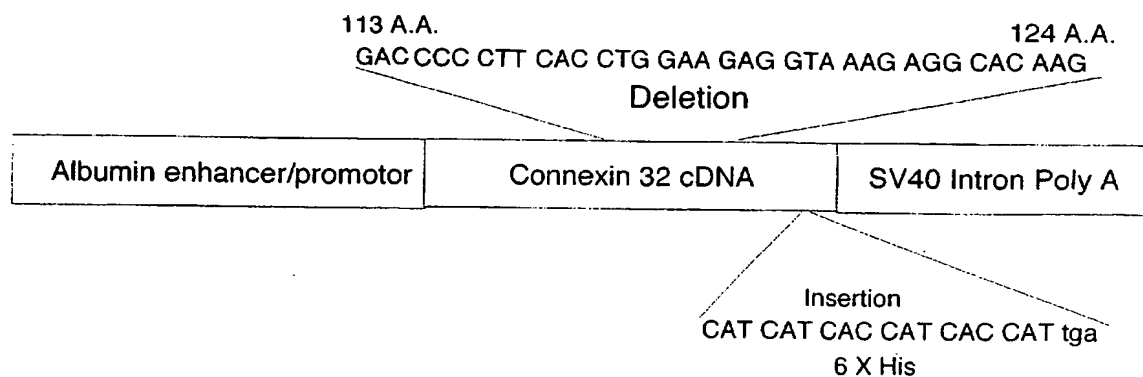
本発明のトランスジェニックラット及び野生型ラットに対して、ジエチルニトロサミンを投与し、20 週間観察した結果の肝前がん病変マーカーの免疫染色写真、及び病巣の単位面積あたりの細胞巣数と面積を計測した結果を示す図である。

【図 5】

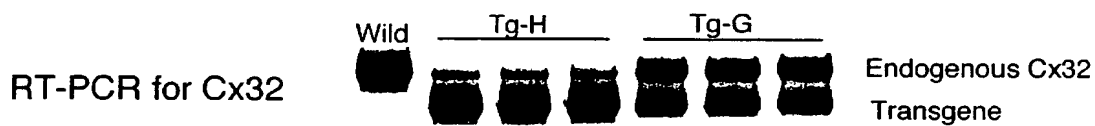
本発明のトランスジェニックラット (Tg) 及び野生型ラット (Wild) の肝における CYP1A1 と CYP1A2 の発現を比較すると、トランスジェニックラットの方が、はるかに高い発現を示している結果を示す図である。

【書類名】 図面

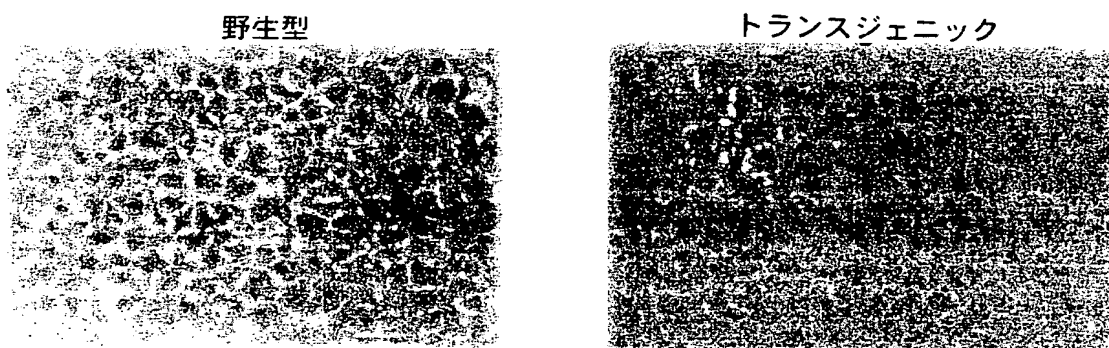
【図 1】



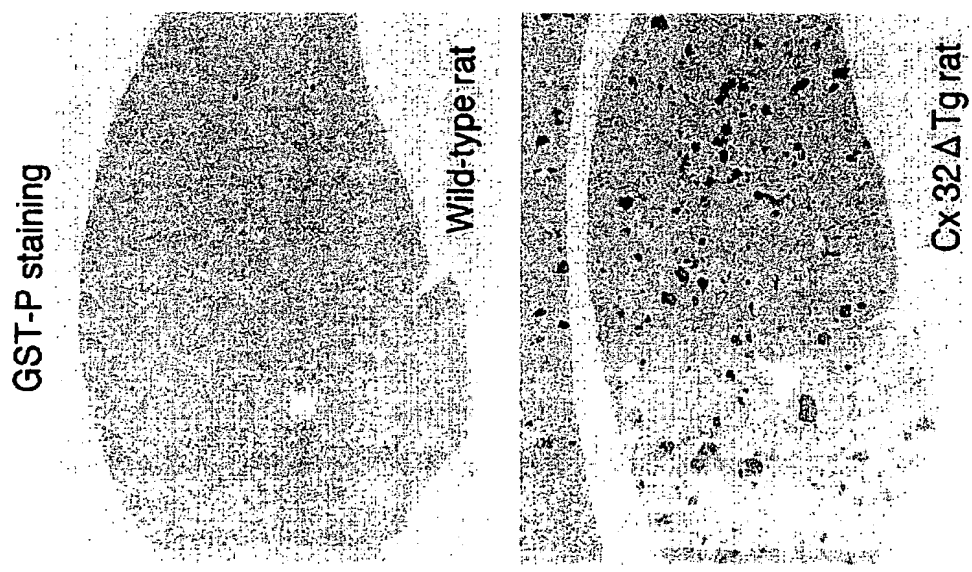
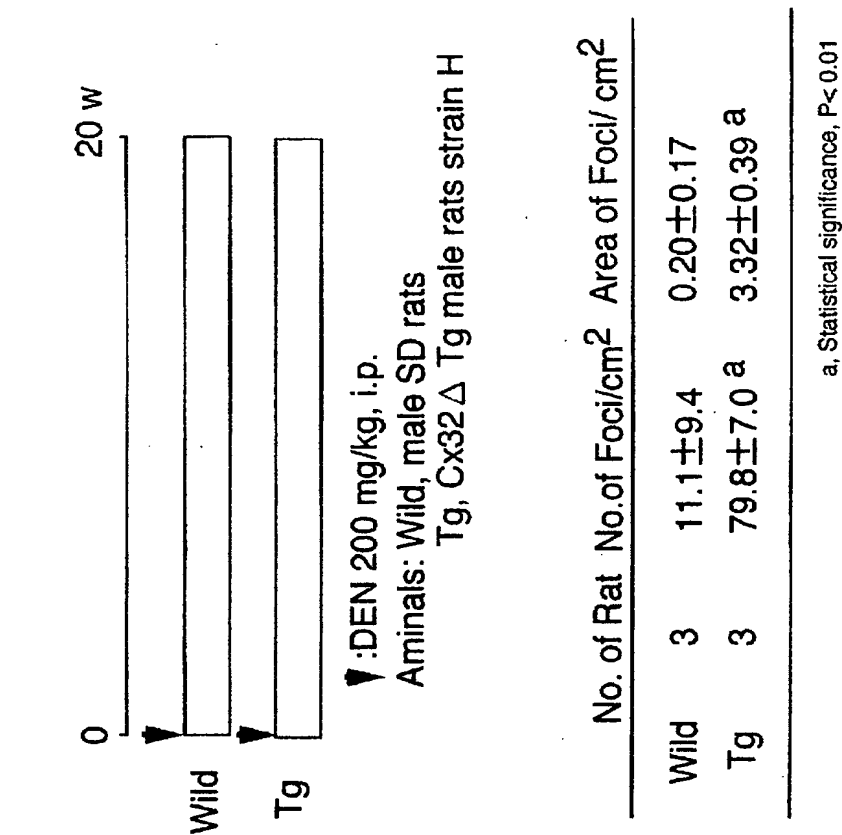
【図 2】



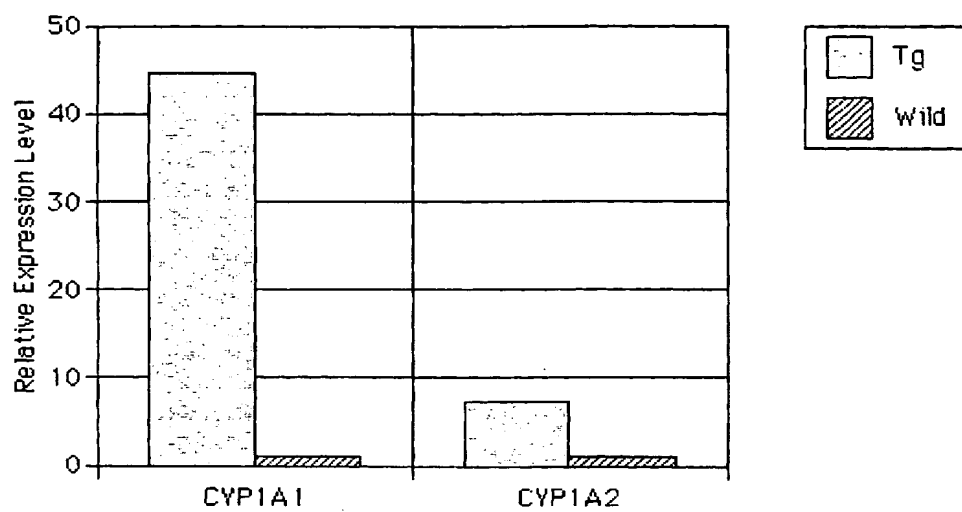
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 短期間に、高感度でより簡便に発がん物質の検出を可能とするために、発がん物質に高感受性を有するラットを提供すること、及び該ラットを用いて、発がん物質を検出する方法、更には、がんを発症させた該ラットを用いて抗がん物質のスクリーニングを行う方法を提供すること。

【解決手段】 ギャップジャンクションにおける正常機能が阻害されたラットが、発がん物質に高感受性を持つことを見い出した。ギャップジャンクションにおける正常機能の阻害には、コネクシンの遺伝子の一部を欠失し、コネクシン機能の欠失した遺伝子を組み込んだプラスミドベクターをラットに導入してトランスジェニックラットを作製する。本発明のラットを用いることにより、短期間に、高感度でより簡便に発がん物質の検出を行うことが可能となり、また、がんを発症させた本発明のラットは、抗がん物質のスクリーニングに有効に利用することができる。

【書類名】 出願人名義変更届（一般承継）
【提出日】 平成15年10月31日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2001-253241
【承継人】
【識別番号】 503360115
【住所又は居所】 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構
【代表者】 沖村 憲樹
【連絡先】 〒102-8666 東京都千代田区四番町5-3 独立行政法人科学技術振興機構 知的財産戦略室 佐々木吉正 TEL 03-5214-8486 FAX 03-5214-8417

【提出物件の目録】
【物件名】 権利の承継を証明する書面 1
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。
【物件名】 登記簿謄本 1
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。

特願 2 0 0 1 - 2 5 3 2 4 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [3 9 6 0 2 0 8 0 0]

1. 変更年月日	1 9 9 8 年 2 月 2 4 日
[変更理由]	名称変更
住 所	埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号
氏 名	科学技術振興事業団

特願 2 0 0 1 - 2 5 3 2 4 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 3 3 6 0 1 1 5]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 1 0 月 1 日

[変更理由]

新規登録

住 所

埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号

氏 名

独立行政法人 科学技術振興機構